



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO

TÍTULO: *FOSFATO DE PIRIDOXAL,*
MECANISMOS DE ACCIÓN Y PATOLOGÍAS
ASOCIADAS A SU DEFICIENCIA.

Autor: Eladio Galán Cruz

Tutor: María Fernández Fernández

Convocatoria: Junio 2017

Índice de contenidos

Resumen.....	3
Introducción y antecedentes.....	4
Objetivos.....	13
Metodología.....	13
Resultados y discusiones.....	14
Conclusiones.....	17
Bibliografía.....	18

Resumen

El piridoxal fosfato (PLP) actúa como cofactor de las enzimas que participan en muchas reacciones bioquímicas que afectan el metabolismo de los glúcidos, lípidos, y proteínas siendo el cofactor de más de 140 reacciones enzimáticas en nuestro organismo.

El PLP es probablemente la coenzima más versátil de la naturaleza y fue identificado como tal para transaminasas por Snell en 1940. Posteriormente se supo que actúa como coenzima para cientos de reacciones catalizadas por enzimas en las cuales están involucrados distintos tipos de aminoácidos.

Dada la importancia biológica de algunos de estos aminoácidos se ha profundizado, durante los últimos años, en el estudio del mecanismo químico por el cual actúan estos enzimas.

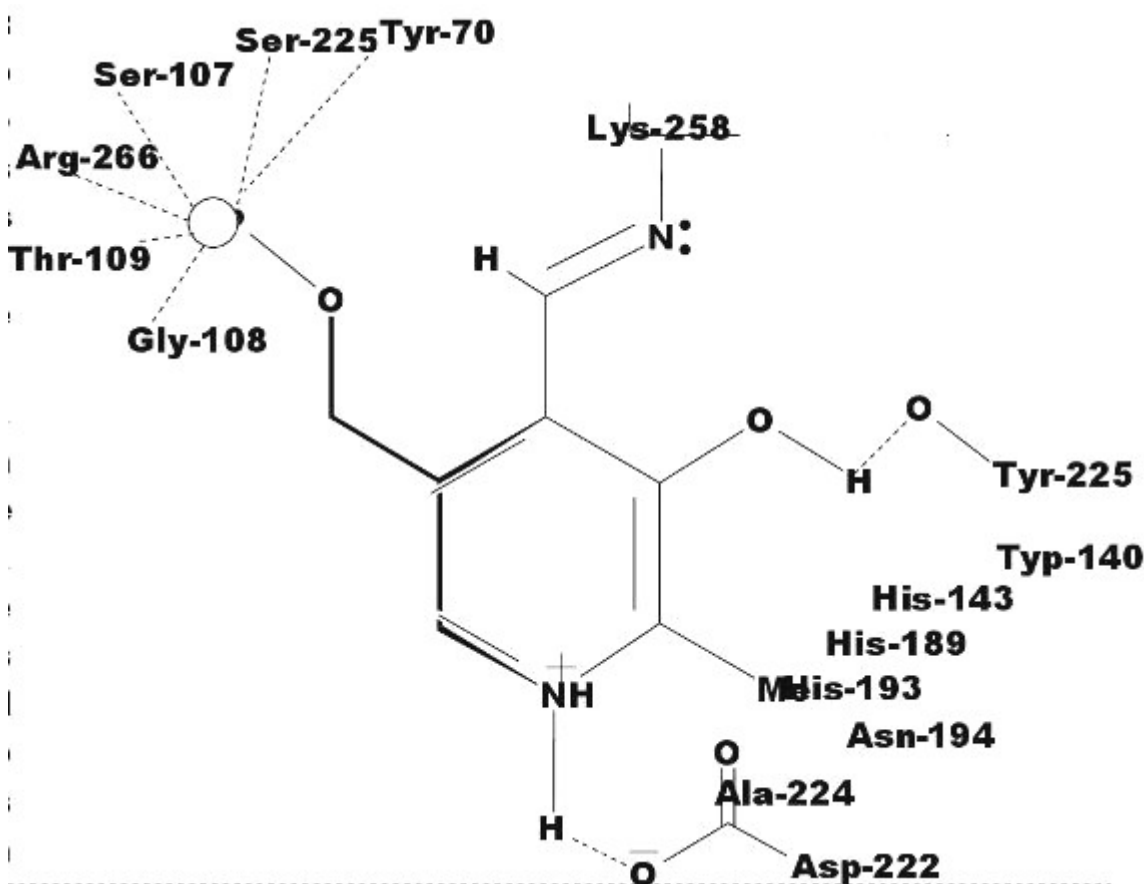


Ilustración. Unión del PLP en el centro activo de la transaminasa

El déficit de PLP puede causar diferentes enfermedades. Una de ellas es la encefalopatía epiléptica sensible al PLP, provocada por la deficiencia de piridoxamina 5'-fosfato oxidasa (PNPO), la cual es una oxidasa dependiente de flavin-mononucleótido (FMN) que actúa en la síntesis del piridoxal fosfato a partir de piridoxina y piridoxamina.

Introducción y antecedentes

La vitamina B6 es una vitamina hidrosoluble que se ingiere con la dieta debido a que el cuerpo es incapaz de sintetizarla. Se encuentra en diversos alimentos como en la carne, legumbres, aguacate, maíz, nueces, panes y cereales enriquecidos (1).

El piridoxal, junto con la piridoxina y la piridoxamina, es una de las tres formas químicas no fosforiladas en las que se manifiesta la vitamina B6.

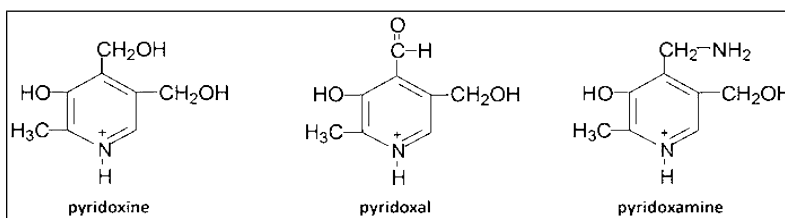


Ilustración 1. Formas no fosforiladas del piridoxal

El derivado éster fosfato del piridoxal, piridoxal 5'-fosfato (PLP), es el cofactor de la mayoría de las enzimas dependientes de la vitamina B6 en el cuerpo y participa en más de un 4% de todas las reacciones enzimáticas. Añadiendo las formas fosforiladas de la piridoxina y la piridoxamina obtenemos las 6 formas comunes que conforman la vitamina B6. (2) (3)

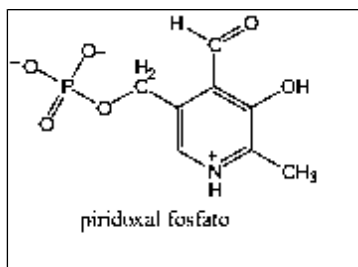


Ilustración 2. Forma fosforilada del piridoxal

El PLP participa en el metabolismo de ácidos grasos y en reacciones de procesos biológicos esenciales como la biosíntesis de la hemoglobina y aminoácidos. También actúa como coenzima para la glucógeno fosforilasa, una enzima que cataliza la liberación de la glucosa del glucógeno almacenado. El PLP también tiene la función de participar en la gluconeogénesis generando glucosa a partir de aminoácidos.

Una dieta balanceada y variada cubrirá los requerimientos diarios de vitamina B6. Esta dieta es una ayuda en la prevención en la aparición de enfermedades asociadas al déficit PLP (forma activa) como la encefalopatía epiléptica sensible al PLP y las enfermedades cardiovasculares asociadas a la hiperhomocisteinemia.

Ingestas de referencia en la dieta para la vitamina B6

Edad	Ingesta	Edad	Ingesta (mg/día)	
<u>Bebés y niños</u>	(mg/día)	<u>Adolescentes y adultos</u>	Hombres	Mujeres*
<u>0-6 meses</u>	0.1	<u>14-50 años</u>	1.3	---
<u>7-12 meses</u>	0.3			
<u>1-3 años</u>	0.5	<u>14-18 años</u>	---	1.2
<u>4-8 años</u>	0.6			
		<u>18-50 años</u>	---	1.3
<u>9-13 años</u>	1	<u>Más de 50 años.</u>	1.7	1.5

*1.9 mg/día durante el embarazo y 2 mg/día durante la lactancia en todas las edades. {4}

Reactividad

El PLP es muy flexible, y por lo tanto muy estable, ya que contiene un anillo de piridina ligeramente básico y un hidroxilo que es ligeramente ácido.

El grupo más importante del PLP es el aldehído. El piridoxal fosfato se une covalentemente al centro activo de la enzima correspondiente a través del grupo amino épsilon de un residuo de lisina, y durante la reacción se transfiere al aminoácido, formando una base de Schiff con el grupo α -amino del aminoácido, denominada aldimina interna, a partir de la cual se producen las modificaciones químicas que conducen a las diferentes reacciones PLP dependientes.

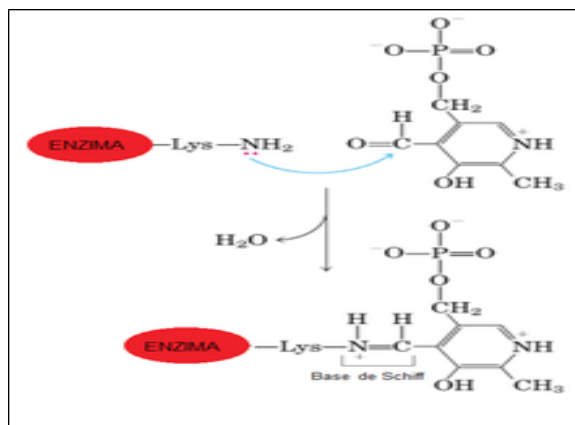
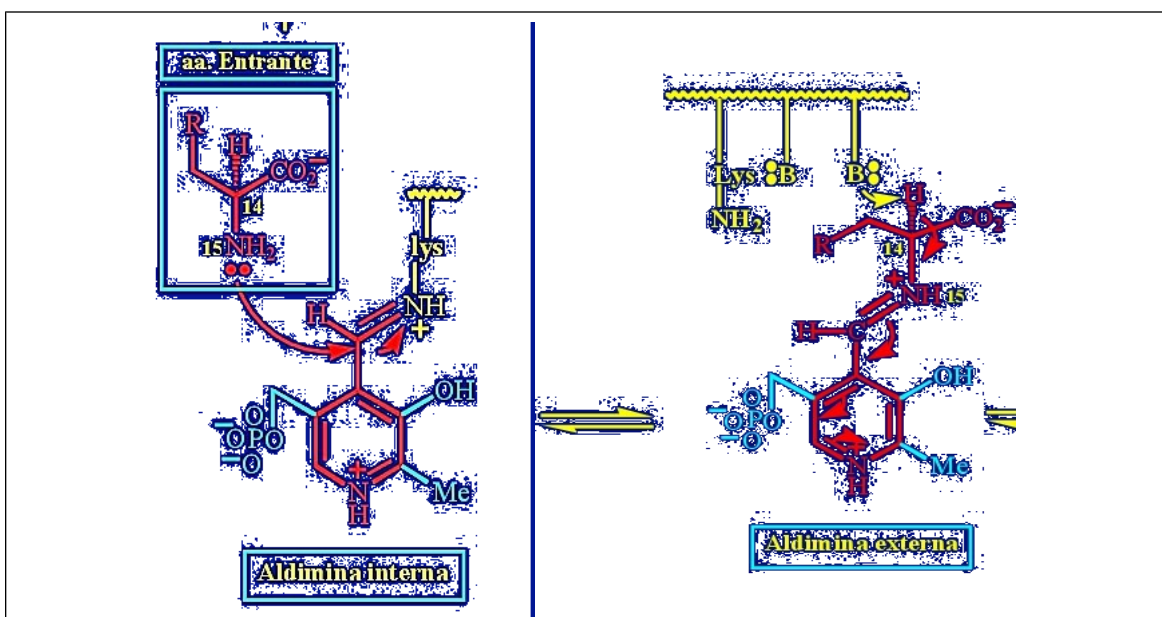


Ilustración 3. Unión de la coenzima PLP, que se modifica a piridoxamina-fosfato, al amino épsilon de un residuo de lisina de la enzima correspondiente formándose la aldimina interna. (5)

Todas las reacciones catalizadas por enzimas dependientes de PLP (a excepción de algunas enzimas como la glucógeno fosforilasa) tienen en común una reacción de transaldiminación, donde un aminoácido sustrato ataca al carbonilo activado de la base de Schiff. A continuación, la Lys se libera de forma que se crea una nueva base de Schiff con el grupo α -amino del aminoácido entrante, denominada aldimina externa. A partir de esta aldimina externa parten las diversas reacciones PLP dependientes. (6)



La aldimina externa resultante puede perder un protón, dióxido de carbono, o la cadena lateral del aminoácido para formar un intermediario quinoide, el cual puede además actuar como nucleófilo en numerosas vías de reacción.

Sistema π - electrón

En la aldimina externa el grupo piridinio actúa como un sumidero de electrones siendo capaz de estabilizar los electrones de los diferentes enlaces por resonancia en el sistema π conjugado. Debido a esta característica, los enlaces pueden romperse de una manera no enzimática. Por esta razón, se produce la escisión heterolítica de cualquier enlace con el $C\alpha$ (excepto $C\alpha$ -N) formándose, a partir de la aldimina externa, carbaniones perfectamente estabilizados

En la aldimina externa se producen 3 formas de resonancia. Una de ellas, el quinoide (se llama así porque se asemeja a la forma de una quinona), se considera el principal responsable del poder catalítico del PLP, ya que los electrones de $C\alpha$ se neutralizan con el N de la piridina protonada (6).

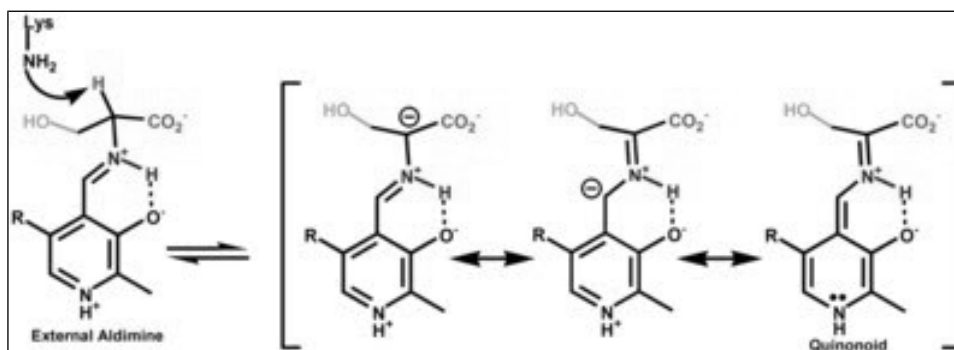


Ilustración 4. Formas de resonancia del PLP

Si el enlace a romper se dispone en un plano perpendicular al plano del sistema de electrones π de la aldimina se produce la escisión. En esta conformación de la aldimina se produce un solapamiento máximo de los electrones π y se reduce al mínimo la energía del estado de transición de dicho enlace, produciéndose así la rotura de éste. (7)

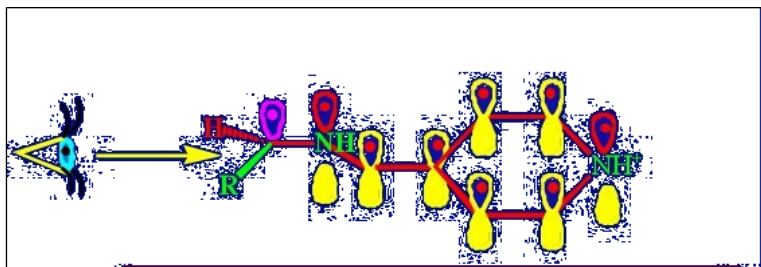


Ilustración 5. Sistema π -electron de la PLP-imina.

Las enzimas PLP-dependientes serán las encargadas de romper este enlace dando lugar a diversas reacciones dependiendo del sustrato y del sitio activo del enzima. (8) (9)

Transaminación

Las transaminasas necesitan el piridoxal fosfato para ejercer su función; actúa como transportador del grupo amino entre los sustratos, alternando su estructura entre la forma aldehídica (piridoxal fosfato, PLP) y la forma aminada (piridoxamina-5-fosfato, PMP).

Las transaminasas catalizan las reacciones de transaminación, importantes en especial para la síntesis de aminoácidos no esenciales y para la degradación de la mayoría de aminoácidos, que pierden su grupo amino por transaminación, excepto los aminoácidos lisina y treonina, para los que esta reacción no es posible.

La transaminación consiste en transportar un grupo α -amino desde un α -aminoácido donador, al carbono ceto de un α -cetoácido receptor. Este proceso tiene lugar en dos etapas y lo catalizan las aminotransferasas específicas de cada sustrato. (10) (11)

- a) En la primera etapa, un α -aminoácido que actuará como donador transfiere el grupo α -amino a la enzima transaminasa, produciendo el correspondiente α -cetoácido y la enzima quedará aminada.

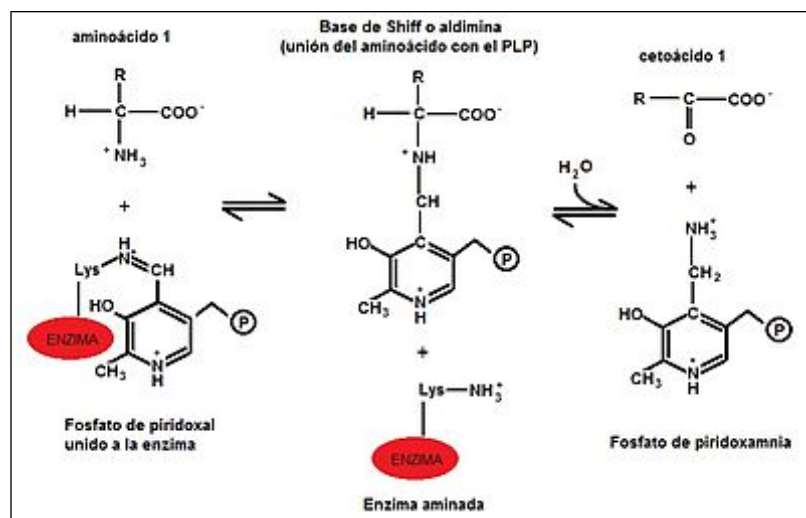


Ilustración 6. Primera etapa de la Transaminación.

- b) En una segunda etapa, el grupo amino se transfiere a un α -cetoácido aceptor diferente al de la primera etapa formando un nuevo aminoácido y regenerando la enzima. En este proceso se regenera el PLP y se produce un nuevo aminoácido debido a la transferencia del grupo amino (que procede del aminoácido sustrato) al segundo sustrato, el nuevo α -cetoácido entrante.

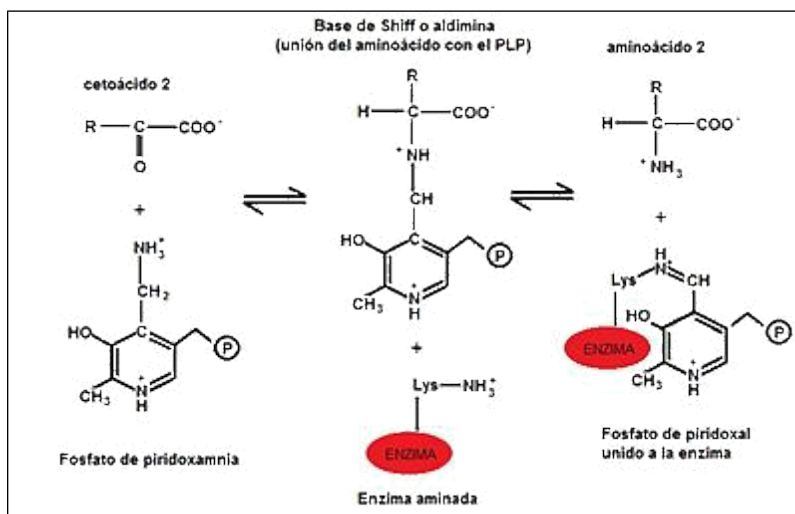


Ilustración 7. Segunda fase de la Transaminación

La reacción de la aminotransferasa ocurre mediante un mecanismo de tipo ping-pong.

(12)

Racemización

En la racemización se produce la conversión de un L-aminoácido en D-aminoácido y viceversa. Una base de la enzima roba el protón en alfa de la aldimina externa formándose un carbanión muy estable al estar deslocalizado. Este carbanión se vuelve a protonar por la cara opuesta en la misma posición generándose el otro enantiómero diferente al de partida.

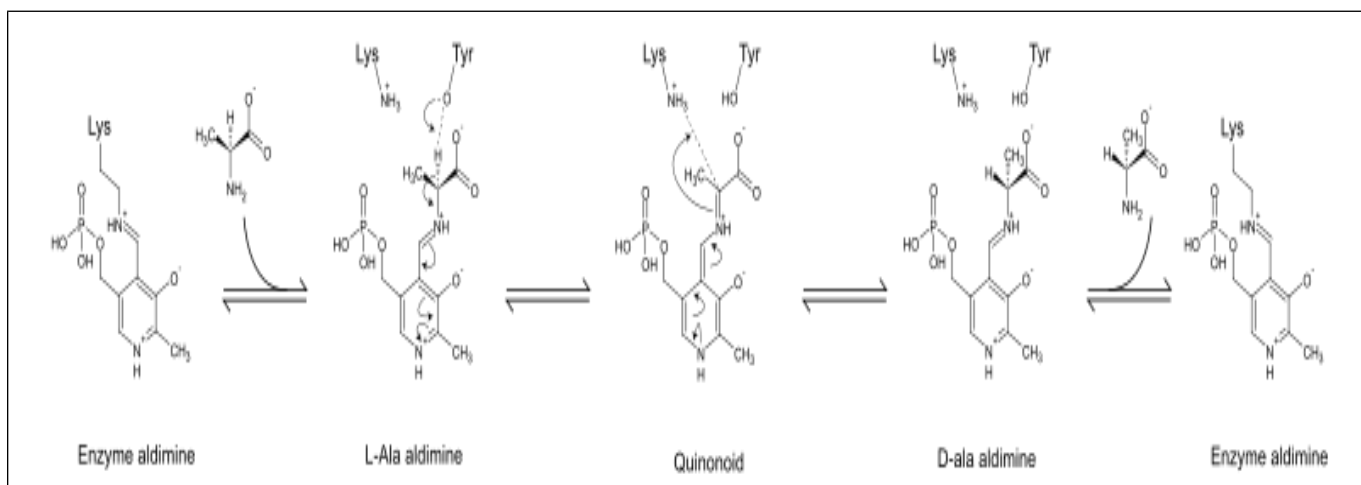


Ilustración 7. Racemización de la Alanina

La enzima (O-Tyr) roba el protón en alfa al N de la aldimina y se forma un carbanión estable al estar deslocalizado. Este protón que se ha robado forma parte del aminoácido alanina que previamente se había unido a la aldimina externa. De esta manera se forma un carbanión que se vuelve a protonar, pero esta vez por la cara opuesta generándose el otro enantiómero del aminoácido inicial. Una vez formado este enantiómero se produce el ataque del residuo de Lys liberándose de nuevo el aminoácido, y por otra parte, regenerándose la aldimina.

Descarboxilación

Las descarboxilasas, que son enzimas PLP-dependientes, catalizan la transformación de aminoácidos en aminas. Este proceso se produce debido a que el grupo carboxílico se orienta perpendicularmente a la imina produciéndose la pérdida del CO_2 de la aldimina externa. Estas aminas tienen diversas funciones biológicas. De esta manera se forma el quinonoide que posteriormente se protona formándose una nueva aldimina externa que, por hidrólisis, libera la amina y se regenera el PLP-enzima. (13) (14).

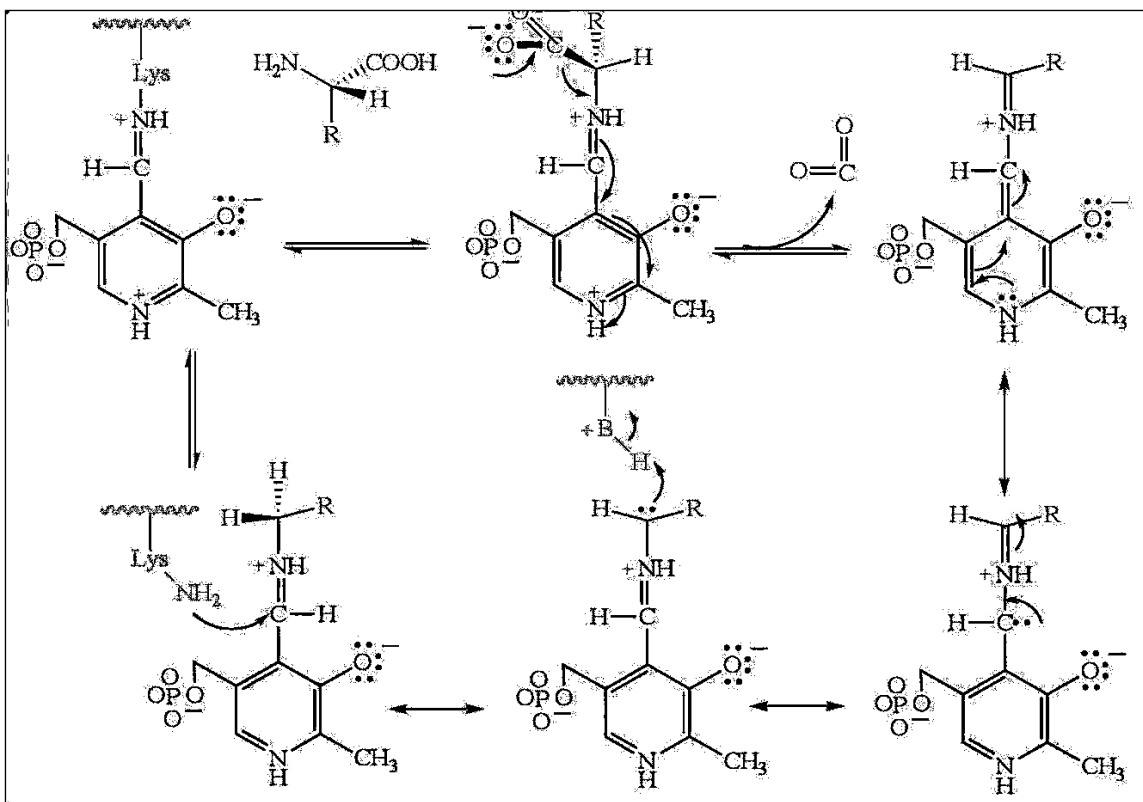


Ilustración 8. Mecanismo de descarboxilación por las descarboxilasas

Objetivos

Los objetivos principales del trabajo son los siguientes:

- Conocer los diferentes mecanismos de acción del piridoxal fosfato en ciertas enzimas PLP dependientes.
- Demostrar la gran importancia que tiene en el organismo el PLP analizando los problemas que produciría su deficiencia.
- Conocer en profundidad la encefalopatía epiléptica sensible al PLP, una patología producida debido a un defecto en la síntesis del PLP, así como sus síntomas, diagnóstico diferencial y tratamiento.

Metodología

El método principal utilizado en este trabajo fue la revisión bibliográfica.

Para esta búsqueda, se utilizaron diversas bases de datos que se encuentran en internet, siendo consultada Pubmed (NCBI), utilizando las palabras clave como “pyridoxal phosphate”, “deficit”, “metabolism”, “PNPO”, “disease”, dando preferencia a aquellas publicaciones posteriores al año 2000, ya que el trabajo se centra en una enfermedad relacionada con el déficit de PLP descubierta a partir de ese año. Además, se recopiló información sobre enfermedades relacionadas con el déficit del PLP en diferentes páginas webs, destacando entre ellas la de Guía Metabólica. Durante la preparación y redacción de este trabajo, fueron consultados también diversas presentaciones de Power Point aportadas por el tutor, de las que se extrajeron imágenes para completar la información teórica del trabajo. El resto de imágenes se obtuvieron de las diversas páginas webs a las que hago referencia en la bibliografía.

Con esta revisión bibliográfica, se obtienen ejemplos de las diferentes reacciones de las que el PLP es cofactor, así como de las enfermedades asociadas a su deficiencia.

Resultados y discusiones

En este apartado se va a observar la importancia de la PNPO, que es la enzima encargada de la formación del PLP, así como analizar la patología que se produciría si hubiera un déficit de esta enzima. (14)

Función de la piridox(am)ina 5'-fosfato oxidasa (PNPO)

La PNPO es una oxidasa que depende de flavinmononucleótido (FMN) y actúa en la síntesis de PLP a partir de los ésteres fosforados de piridoxina y piridoxamina.

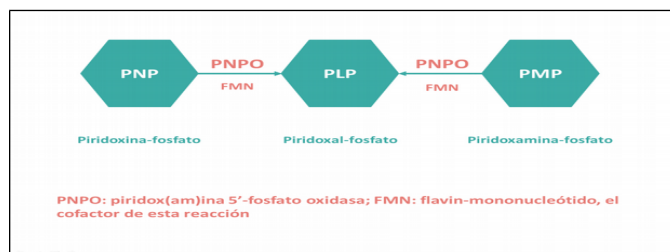


Ilustración 9.Función de la PNPO

Un déficit de esta enzima impide la formación del PLP produciéndose con ello diversas alteraciones en las enzimas que utilizan al PLP como cofactor.

La deficiencia de PNPO se produce debido a mutaciones en el gen PNPO, se producen cambios estables y hereditarios en el gen que codifica a esta proteína enzimática (PNPO).

La deficiencia es producida por un tipo de herencia autosómica recesiva. Ambos padres suelen ser portadores de una mutación en el gen que codifica a la enzima, presenten o no

manifestación clínica. La patología aparece si ambos padres pasan al hijo un alelo mutado de este gen.

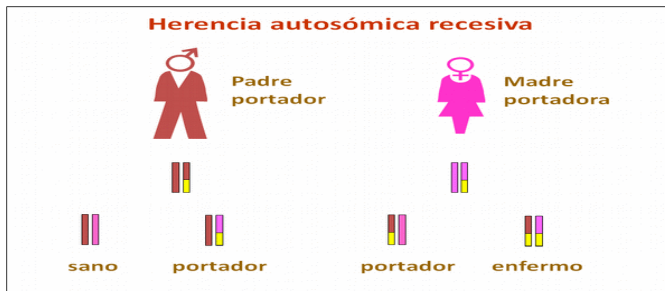


Ilustración 9. Funcionamiento Herencia autosómica recesiva

Sintomatología

Las primeras manifestaciones de los pacientes consistían en una encefalopatía neonatal, refractaria a fármacos antiepilépticos y sensible (con buena respuesta) a PLP.

Nada más producirse el parto suelen producirse ciertas dificultades respiratorias neonatales, que pueden requerir intubación y respiración asistida. Sin embargo, estas manifestaciones no se producen en muchos niños, que nacen a término y no presentan enfermedad al nacer.

Las convulsiones suelen comenzar en las primeras horas de vida, aunque minoritariamente las presentan en los primeros meses de vida. Estas convulsiones pueden ir acompañadas de hipotonía e irritabilidad.

Otro síntoma característico de los pacientes con mutaciones en el gen PNPO es la prematuridad del parto. En estos casos, los pacientes han descrito movimientos intrauterinos anormales y signos de sufrimiento fetal.

Factores causantes de la deficiencia

Algunas mutaciones del gen permiten presentar una cierta actividad residual de PNPO, de tal manera que el déficit de esta enzima no sea tan grave. El estado vitamínico del neonato, tanto de piridoxina como de riboflavina, también influye en esta patología ya

que la PNPO es una enzima que depende de un derivado de esta vitamina, flavinmononucleótido (FMN). Cuanto peor es el estado vitamínico del paciente más grave será la patología.

Diagnóstico

Si existe una sospecha clínica y el paciente ha respondido al tratamiento, para establecer el diagnóstico tendremos que excluir los marcadores bioquímicos de otras encefalopatías epilépticas neonatales, especialmente la deficiencia de antiquitina (que cursa con elevación de α -aminoadípico semialdehído y ácido α -aminoadípico en plasma, orina y LCR). Esto constituiría el diagnóstico diferencial con respecto a la deficiencia de antiquina.

La cuantificación de piridoxal fosfato en el líquido cefalorraquídeo es un dato muy sensible pero poco específico, es decir, los bajos niveles de PLP no es sinónimo de presentar la deficiencia de la enzima.

El **diagnóstico definitivo** se basa en el estudio mutacional del gen PNPO, que permite el diagnóstico prenatal y el consejo genético.

Tratamiento

Se identifican 2 grupos de pacientes en relación con su respuesta al tratamiento:

1. Pacientes con epilepsia neonatal que responden al tratamiento con PLP
2. Pacientes con epilepsia que responden a piridoxina.

Los primeros pacientes descritos sólo respondían al tratamiento con PLP y no con piridoxina.

Algunas mutaciones de PNPO permiten una cierta actividad enzimática residual, capaz de convertir piridoxina en PLP. Debido a esta razón, la piridoxina puede ser eficaz como tratamiento. Sin embargo, también podrían influir en esta respuesta a piridoxina otros factores como prematuridad, la edad del paciente y su estado de riboflavina, ya que la PNPO es una enzima dependiente de flavina-mononucleótido.

Una elevada concentración de PLP inhibe la actividad enzimática residual de PNPO por lo que, aunque sea una paradoja, el paso de tratamiento con piridoxina a terapia con PLP puede empeorar el control de la epilepsia en algunos pacientes,

Niveles elevados de PLP pueden ser tóxicos para el hígado, por lo que se debe monitorizar la función hepática en los pacientes en tratamiento. La deficiencia de PNPO no tratada generalmente tiene muy mal pronóstico.

Conclusiones

El piridoxal fosfato es una molécula muy importante en los procesos bioquímicos que se producen en el organismo debido a la diversidad de los sistemas enzimáticos en los que participa tales como la transaminación, la descarboxilación y la racemización entre otros.

La enzima PNPO es necesaria para la obtención de PLP a partir de los ésteres fosforados de piridoxina y piridoxamina.

La deficiencia de PNPO causa una encefalopatía epiléptica grave. El diagnóstico y tratamiento precoces mejoran el pronóstico y la calidad de vida de los pacientes y hay que añadir que la administración de PLP no puede retrasarse hasta que se obtenga la evidencia bioquímica completa.

Bibliografía

1. Dakshinamurti S, Dakshinamurti K. Vitamin B₆. In: Zempleni J, Rucker RB, McCormick DB, Suttie JW, eds. Handbook of Vitamins. 4th ed. New York: CRC Press (Taylor & Francis Group); 2007:315-359.
2. Galluzzi L, Vacchelli E, Michels J, et al. Effects of vitamin B₆ metabolism on oncogenesis, tumor progression and therapeutic responses. *Oncogene*. 2013;32(42):4995-5004. (PubMed)
3. McCormick DB. Vitamin B₆. In: Bowman BA, Russell RM, eds. Present Knowledge in Nutrition. Vol. I. Washington, D.C.: International Life Sciences Institute; 2006:269-277.
4. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. Vitamin B₆. Dietary Reference Intakes: Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B₆, Vitamin B₁₂, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline. Washington D.C.: National Academies Press; 1998:150-195. (National Academies Press)
5. Tejedor, Cristina (2010). «Reacciones generales del metabolismo de los aminoácidos». Universidad de Alcalá.

6. Lab Toney [Sede Web]. California: Michael D Toney; Disponible en: <https://sites.google.com/site/mdtoneylab/research/pyridoxal-phosphateenzymes>
7. Richard B. Silverman. The Organic Chemistry of drug Design and Drug Action. 3ª ed. California: Academic Press; 2014, 178.
8. Toney MD. Controlling reaction specificity in pyridoxal phosphate enzymes. Biochim Biophys Acta – Proteins and Proteomics. [Internet]. 2011 1814(11):1407-18. Disponible: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3359020/>
9. Banks MA, Persily GL. Campus perspective on the National Institutes of Health public access policy: University of California, San Francisco, library experience. J Med Libr Assoc. [Internet]. 2010.98 (3): 256-9. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3359020/>
10. N. M. F. S. A. Cerqueira, P. A. Fernandes, M. J. Ramos (2011). «Computational Mechanistic Studies Addressed to the Transamination Reaction Present in All Pyridoxal 5'-Phosphate-Requiring Enzymes». *Journal of Chemical Theory and Computation* 7 (5): 1356-1368. doi:10.1021/ct1002219.
11. King, Michael (28 de noviembre de 2010). «Metabolismo del Nitrógeno».
12. Vázquez Contreras, Edgar (10 de octubre de 2003). «Transaminación de los aminoácidos». Instituti de Química, UNAM.
13. Martell AE. Vitamin B6 catalyzed reaction of α -amino and α -keto acids: model systems. Acc Chem Res. 1989; 22 (4): 115-24.

14. Palcic, M. M.; Floss, H. G. Conformation and stereochemistry of free and bound pyridoxal phosphate and its derivatives. In: Vitamin B6 pyridoxal phosphate, chemical, biochemical, and medicinal aspects. Part A. Ed. Wiley-Interscience, New York, 1986.
15. <https://www.guiametabolica.org/ecm/deficiencia-pnpo/info/es-deficiencia-pnpo>